

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

16. 6. 2004

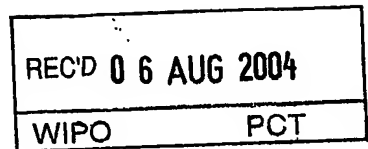
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年   6 月 1 6 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 1 7 0 3 2 7  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [ J P 2 0 0 3 - 1 7 0 3 2 7 ]

出 願 人      独立行政法人理化学研究所  
Applicant(s):      株式会社医学生物学研究所

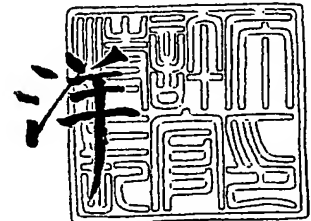


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   7 月 2 2 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願

【整理番号】 A31368A

【提出日】 平成15年 6月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

【氏名】 宮脇 敦史

【発明者】

【住所又は居所】 長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063-103 株式会社医学生物学研究所 伊那研究所内

【氏名】 唐澤 智司

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205404

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 コモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の下記の特性を有する  
蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が 557 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 574 nm である；
- (3) 557 nm におけるモル吸光係数が 41750 である；
- (4) 量子収率が 0.41 である；
- (5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a < 約 4.0$  である；

【請求項 2】 以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、  
置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列：

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 4】 以下の何れかの DNA。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、  
置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードする DNA：

【請求項 5】 以下の何れかの塩基配列を有する DNA。

- (a) 配列番号 2 に記載の塩基配列；又は、
- (b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び  
／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

【請求項 6】 請求項 4 又は 5 に記載の DNA を有する組み換えベクター。

【請求項 7】 請求項 4 又は 5 に記載の DNA 又は請求項 6 に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

【請求項 8】 請求項 1 又は 2 に記載の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る  
融合蛍光蛋白質。

【請求項 9】 他の蛋白質が細胞内に局在する蛋白質である、請求項 8 に記載の融合蛍光蛋白質。

【請求項 10】 他の蛋白質が細胞内小器官に特異的な蛋白質である、請求項 8 又は 9 に記載の融合蛍光蛋白質。

【請求項 11】 請求項 8 から 10 の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法。

【請求項 12】 請求項 1 又は 2 に記載の蛍光蛋白質、請求項 3 から 5 の何れかに記載の DNA、請求項 6 に記載の組み換えベクター、請求項 7 に記載の形質転換体、又は請求項 8 から 10 の何れかに記載の融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な蛍光蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、コモンサンゴ (Montipora sp.) 由来の新規な蛍光蛋白質及びその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

クラゲのエクオレア・ビクトリア (Aequorea victoria) に由来する緑色蛍光蛋白質 (GFP) は、生物系において多くの用途を有する。最近、ランダム突然変異誘発法および半合理的 (semi-rational) 突然変異誘発法に基づいて、色を変化させたり、折りたたみ特性を改善したり、輝度を高めたり、あるいは pH 感受性を改変したといった様々な GFP 変異体が作製されている。遺伝子組み換え技術により他の蛋白質を GFP 等の蛍光蛋白質に融合させて、それらの発現および輸送のモニタリングを行うことが行われている。

【0003】

最もよく使用される GFP 変異体の一つとして黄色蛍光蛋白質 (YFP) が挙げられる。YFP は、クラゲ (Aequorea) GFP 変異体の中でも最長波長の蛍光を示す。大部分の YFP の  $\epsilon$  および  $\Phi$  は、それぞれ  $60,000 \sim 100,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  およ

び0.6~0.8であり (Tsien, R. Y. (1998). Ann. Rev. Biochem. 67, 509-544)、これらの値は、一般的な蛍光団 (フルオレセインおよびローダミンなど) の値に匹敵する。従って YFP の絶対的輝度の改善は、ほぼ限界に達しつつある。

#### 【0004】

また、GFP 変異体の他の例として、シアン蛍光蛋白質 (CFP) があり、E CFP (enhanced cyan fluorescent protein) が知られている。また、イソギンチャク (*Discoma* sp.) からは赤色蛍光蛋白質 (RFP) も単離されており、Das Red が知られている。このように蛍光蛋白質は、緑色、黄色、シアン色、赤色の4種が次々と開発されスペクトルの範囲は大幅に広がっている。

#### 【0005】

また、刺胞動物には、蛍光を発するものが存在する。刺胞動物由来の蛍光蛋白質遺伝子のクローニングが試みられているが、蛍光および生化学的な特性のレパートリーを増やすためには、より多くの遺伝子のクローニングが必要である。

#### 【0006】

##### 【非特許文献1】

Tsien, R. Y. (1998). Ann. Rev. Biochem. 67, 509-544

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、コモンサンゴ (*Montipora* sp.) に由来する、新規な蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、従来の RFP (DsRed、クロンテック社) の示す幅広い励起スペクトルに比べ、よりシャープなスペクトルを有する蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために本発明者らは鋭意検討し、既知の蛍光蛋白質のアミノ酸配列の情報に基づいて好適なプライマーを設計し、コモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の cDNA ライブラリーから上記プライマーを用いて新規な蛍光蛋白質をコードする遺伝子を増幅してクローニングすることに成功した。さらに本発明者らは、得られたコモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の蛍光蛋白質の蛍光

特性及び pH 感受性を解析した。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

**【0009】**

即ち、本発明によれば、コモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質が提供される。

- (1) 励起極大波長が 557 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 574 nm である；
- (3) 557 nm におけるモル吸光係数が 41750 である；
- (4) 量子収率が 0.41 である；
- (5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a < 約 4.0$  である；

**【0010】**

本発明の別の側面によれば、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が提供される。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光を有するアミノ酸配列；

**【0011】**

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の蛋白質をコードする DNA が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、以下の何れかの DNA が提供される。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、蛍光蛋白質をコードする DNA；

**【0012】**

本発明のさらに別の側面によれば、以下の何れかの塩基配列を有する DNA が提供される。

- (a) 配列番号 2 に記載の塩基配列；又は、
- (b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び

／又は付加を有する塩基配列を有し、蛍光蛋白質をコードする塩基配列：

【0013】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNAを有する組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNA又は組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

【0014】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質が提供される。

好ましくは、他の蛋白質は細胞内に局在する蛋白質であり、さらに好ましくは、細胞内小器官に特異的な蛋白質である。

【0015】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法が提供される。

【0016】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター、形質転換体、又は融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キットが提供される。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明の蛍光蛋白質

本発明の蛍光蛋白質は、コモンサンゴ (Montipora sp.) 由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 励起極大波長が557 nmである；
- (2) 蛍光極大波長が574 nmである；
- (3) 557 nmにおけるモル吸光係数が41750である；
- (4) 量子収率が0.41である；



(5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a < \text{約} 4.0$  である:

【0018】

コモンサンゴ (*Montipora* sp.) は、刺胞動物門花虫綱六放サンゴ亜綱イシサンゴ目ミドリイシ科に属するサンゴの 1 種であり、塊状や被覆状の群体を形成することが多い。

【0019】

本発明の蛍光蛋白質は、以下の実施例で示す通り、励起極大波長が  $557 \text{ nm}$  であり、蛍光極大波長が  $574 \text{ nm}$  である。また、 $557 \text{ nm}$  におけるモル吸光係数は  $41750$  であり、量子収率は  $0.41$  である。モル吸光係数は蛍光分子 1 モルあたりの光子の吸収量を表し、量子収率は吸収した光子のどれだけを蛍光として発することができるかを表した数値である。

【0020】

本発明の蛍光蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

(a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列; 又は、

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ蛍光を有するアミノ酸配列:

【0021】

本明細書で言う「1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列」における「1 から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、1 から 20 個、好ましくは 1 から 10 個、より好ましくは 1 から 7 個、さらに好ましくは 1 から 5 個、特に好ましくは 1 から 3 個程度を意味する。

【0022】

本明細書で言う「蛍光を有する」および「蛍光蛋白質」とは、蛍光を発することができる全ての場合を包含し、蛍光強度、励起波長、蛍光波長、pH 感受性などの諸特性は、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質と比較して、変動していてもよいし、同様のままでもよい。

【0023】

本発明の蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを手取することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列並びに配列番号2に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いてコモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来のcDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを取得することができる。本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAの一部の断片を上記したPCRにより得た場合には、作製したDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の蛍光蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の蛍光蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

#### 【0024】

##### (2) 本発明のDNA

本発明によれば、本発明の蛍光蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAの具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

- (a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、
- (b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列をコードし、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA。

本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAのさらなる具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

- (a) 配列番号2に記載の塩基配列を有するDNA；又は、
- (b) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、かつ蛍光蛋白質をコードするDNA；

#### 【0025】

本発明のDNAは、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができるし、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって製造することもできる。本発明のDNA又はその断片の作製方法については、本明細書中上述した通りである。

#### 【0026】

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるPCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するDNAを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びにCurrent Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)に記載されている。

#### 【0027】

##### (3) 本発明の組み換えベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

#### 【0028】

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明のDNAは、転写に必要な要素（例えば、プロモーター等）が機能的に連結されている。プロモーターは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

#### 【0029】

細菌細胞で作動可能なプロモーターとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子(Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene)、バチルス・リケニホルミス $\alpha$ アミラーゼ遺伝子(Bacillus

licheniformis alpha-amylase gene)、バチルス・アミロリケファチエンス・BAN アミラーゼ遺伝子(Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子(Bacillus Subtilis alkaline protease gene)もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子(Bacillus pumilus xylosidase gene)のプロモータ、またはファージ・ラムダの $P_R$ 若しくは $P_L$ プロモータ、大腸菌の lac、trp若しくはtacプロモータなどが挙げられる。

#### 【0030】

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1 (メタロチオネイン遺伝子) プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TP11プロモータ、ADH2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたはtpiAプロモータなどがある。

#### 【0031】

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはTP11ターミネータ若しくはADH3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばSV40エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルスVA RNAをコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

## 【0032】

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) またはシゾサッカロマイセス・ポンベ T P I 遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明の DNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

## 【0033】

(4) 本発明の形質転換体

本発明の DNA 又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明の DNA または組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明の DNA 構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

## 【0034】

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行なえばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK 293 細胞、HeLa 細胞、COS 細胞、BHK 細胞、CHL 細胞または CHO 細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入された DNA 配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

## 【0035】

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属す

る細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) またはサッカロマイセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) 等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

#### 【0036】

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

#### 【0037】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる (例えば、*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、*Bio/Technology*, 6, 47(1988)等に記載)。

#### 【0038】

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda* の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、*Trichoplusia ni* の卵巣細胞である HiFive (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと

上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

#### 【0039】

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛍光融合蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

#### 【0040】

##### (5) 本発明の蛍光蛋白質及びそれを含む融合蛍光蛋白質の利用

本発明は蛍光蛋白質を他の蛋白質と融合させることにより、融合蛍光蛋白質を構築することができる。

本発明の融合蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを手に入れることが必要である。本明細書の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列及び配列番号2に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、本発明の蛍光蛋白質の遺伝子を含むDNA断片を鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAを構築するのに必

要なDNA断片を作製することができる。また同様に、融合すべき蛋白質をコードするDNA断片も入手する。

#### 【0041】

次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛍光蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛍光蛋白質を産生することができる。

#### 【0042】

本発明の蛍光蛋白質は、特に、標識としての利用価値が高い。即ち、本発明の蛍光蛋白質を被検アミノ酸配列との融合蛋白質として精製し、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入し、該融合蛋白質の分布を経時的に観察すれば、被検アミノ酸配列の細胞内におけるターゲッティング活性を検出することが可能である。

#### 【0043】

本発明の蛍光蛋白質を融合させる他の蛋白質（被検アミノ酸配列）の種類は特に限定されるものではないが、例えば、細胞内に局在する蛋白質、細胞内小器官に特異的な蛋白質、ターゲティングシグナル（例えば、核移行シグナル、ミトコンドリアプレ配列）等が好適である。なお、本発明の蛍光蛋白質は、マイクロインジェクション法などにより細胞内に導入する以外に、細胞内で発現させて用いることも可能である。この場合には、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが発現可能に挿入されたベクターが宿主細胞に導入される。

#### 【0044】

また、本発明の蛍光蛋白質は、レポーター蛋白質としてプロモーター活性の測定に用いることも可能である。即ち、被検プロモーターの下流に、本発明の蛍光蛋白質をコードするDNAが配置されたベクターを構築し、これを宿主細胞に導入し、該細胞から発せられる本発明の蛍光蛋白質の蛍光を検出することにより、被検プロモーターの活性を測定することが可能である。被検プロモーターとしては、宿主細胞内で機能するものであれば、特に制限はない。

#### 【0045】



上記被検アミノ酸配列のターゲティング活性の検出やプロモーター活性の測定において用いられるベクターとしては、特に制限はないが、例えば、動物細胞用ベクターでは、「pNEO」(P. Southern, and P. Berg (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:327)、「pCAGGS」(H. Niwa, K. Yamamura, and J. Miyazaki. Gene 108, 193-200(1991))、「pRc/CMV」(インビトロゲン社製)、「pCDM8」(インビトロゲン社製)などが、酵母用ベクターでは、「pRS303」,「pRS304」,「pRS305」,「pRS306」,「pRS313」,「pRS314」,「pRS315」,「pRS316」(R. S. Sikorski and P. Hieter (1989) Genetics 122: 19-27)、「pRS423」,「pRS424」,「pRS425」,「pRS426」(T. W. Christianson, R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero, and P. Hieter (1992) Gene 110: 119-122)などが好適に用いられる。

#### 【0046】

また、使用可能な細胞の種類も特に限定されず、各種の動物細胞、例えば、L細胞、BalbC-3T3細胞、NIH3T3細胞、CHO(Chinese hamster ovary)細胞、HeLa細胞、NRK(normal rat kidney)細胞、「*Saccharomyces cerevisiae*」などの酵母細胞や大腸菌 (*E. coli*) 細胞などを使用することができる。ベクターの宿主細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウム法やエレクトロポレーション法などの常法により行うことができる。

#### 【0047】

上記のようにして得た、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質(蛋白質Xとする)とを融合させた融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させ、発する蛍光をモニターすることにより、細胞内における蛋白質Xの局在や動態を分析することが可能になる。即ち、本発明の融合蛍光蛋白質をコードするDNAで形質転換またはトランスフェクトした細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより細胞内における蛋白質Xの局在や動態を可視化して分析することができる。

#### 【0048】

例えば、蛋白質Xとして細胞内オルガネラに特異的な蛋白質を利用することにより、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、分泌小胞、ペルオキシソームなどの分布や動きを観察できる。

また、例えば、神経細胞の軸索、樹状突起などは発生途中の個体の中で著しく

複雑な走向の変化を示すので、こういった部位を蛍光ラベルすることにより動的解析が可能になる。

#### 【0049】

本発明の蛍光蛋白質の蛍光は、生細胞のまま検出することが可能である。この検出は、例えば、蛍光顕微鏡（カールツァイス社 アキシオフォト フィルターセット09）や画像解析装置（ATTO デジタルイメージアナライザー）などを用いて行うことが可能である。

顕微鏡の種類は目的に応じて適宜選択できる。経時変化を追跡するなど頻回の観察を必要とする場合には、通常の落射型蛍光顕微鏡が好ましい。細胞内の詳細な局在を追及したい場合など、解像度を重視する場合は、共焦点レーザー顕微鏡の方が好ましい。顕微鏡システムとしては、細胞の生理状態を保ち、コンタミネーションを防止する観点から、倒立型顕微鏡が好ましい。正立顕微鏡を使用する場合、高倍率レンズを用いる際には水浸レンズを用いることができる。

#### 【0050】

フィルターセットは蛍光蛋白質の蛍光波長に応じて適切なものを選択できる。本発明の蛍光蛋白質の場合、励起光550～565nm、蛍光570～580nm程度のフィルターを使用することが好ましい。

#### 【0051】

また、蛍光顕微鏡を用いた生細胞での経時観察を行う場合には、短時間で撮影を行うべきなので、高感度冷却CCDカメラを使用する。冷却CCDカメラは、CCDを冷却することにより熱雑音を下げ、微弱な蛍光像を短時間露光で鮮明に撮影することができる。

#### 【0052】

##### (6) 本発明のキット

本発明によれば、本明細書に記載した蛍光蛋白質、融合蛍光蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、細胞内成分の局在の分析及び／又は生理活性物質の分析のためのキットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

蛍光蛋白質又はDNAなどの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

#### 【0053】

##### 【実施例】

実施例 1: イシサンゴからの新規蛍光蛋白遺伝子(COR)の単離、並びに蛍光特性の解析

##### (1) total RNAの抽出

珊瑚より蛍光蛋白遺伝子の単離を行った。材料にはコモンサンゴ (*Montipora* sp.) を用いた。凍結したコモンサンゴを乳鉢で碎き、湿重量2グラムに"TRIzol" (GIBCO BRL) を7.5 ml加えてホモジナイズし、1500×gで10分間遠心した。上清にクロロホルム1.5 mlをくわえ、15秒間攪拌した後3分間静置した。7500×gで15分間遠心した。上清にイソプロパノール3.75 mlをくわえ、15秒間攪拌した後10分間静置した。17000×gで10分間遠心した。上清を捨て70%エタノールを6 ml加えて17000×gで10分間遠心した。上清を捨て沈殿をDEPC水200 $\mu$ lで溶解した。DEPC水で溶解したtotal RNAを100倍に希釈してO.D. 260とO.D. 280の値を測定してRNA濃度を測った。22 $\mu$ gのtotal RNAを得た。

#### 【0054】

##### (2) First strand cDNAの合成

total RNA 4 $\mu$ gを使用し、First strand cDNAの合成キット"Ready To Go" (Amersham Pharmacia) によりcDNA(33 $\mu$ l)を合成した。

#### 【0055】

##### (3) Degenerated PCR

合成したFirst strand cDNA(33 $\mu$ l)のうち3 $\mu$ lを鋳型としてPCRを行った。

プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

使用プライマー

5'-GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY-3' (primer 1) (配列番号 3)

5'-ACVGGDCCATYDGVAAGAAARTT-3' (primer 2) (配列番号 4)

I=イノシン、R=A又はG、Y=C又はT、V=A,C又はG、D=A,G 又はT S=C又はG、H=A  
又はT又はC

#### 【0056】

##### PCR反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 taq バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer1	1 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer2	1 $\mu$ l
ミリQ	35 $\mu$ l
taq polymerase(5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

#### 【0057】

##### PCR反応条件

94°C 1 min(PAD)

94°C 30 sec (変性)

52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記3ステップを35サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

#### 【0058】

一回目のPCR反応で得られた増幅産物1  $\mu$  lをテンプレートとして、もう一度同じ条件でPCRを行った。アガロースゲル電気泳動で、350 bpを切り出し、精製した。

#### 【0059】

##### (4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製したDNA断片をpT7-blue vector(Novagen)にライゲーションした。大腸菌

株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してその DNA 塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5'-RACE 法および 3'-RACE 法による遺伝子全長のクローニングを行った。

#### 【0060】

##### (5) 5'-RACE 法

Degenerated PCR で得られた DNA 断片の 5' 側の塩基配列を決定するために 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL) を用いて、5'-RACE 法を行った。鋳型として (1) で調製した total RNA を 5  $\mu$ g 使用した。

dC-tailed cDNA の一回目の増幅には

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (primer 3) (配列番号 5)

5'-CCATCTTCAAAGAGAAAAGACCTTT-3' (primer 4) (配列番号 6)

のプライマーを用いた。

I=イノシン

二回目の増幅には

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (primer 5) (配列番号 7)

5'-CATGAGTTCTTGAAATAGTCAAC-3' (primer 6) (配列番号 8)

のプライマーを用いた。PCR 反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

#### 【0061】

アガロースゲル電気泳動で、増幅された 350bp のバンドを切り出し、精製した。精製した DNA 断片を pT7-blue vector (Novagen) にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNA を精製して、挿入された DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーにより決定した。

#### 【0062】

##### (6) 3'-RACE 法

Degenerated PCRで得られたDNA断片の3'側部分は、(4)の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴdTプライマーのPCRで得た。鋳型として(2)で調製したfirst strand cDNAを3 $\mu$ l使用した。

作成したプライマーは

5'-ATGGCTCTTTCAAAGCACGGTC-3' (primer 7) (配列番号9)

#### 【0063】

PCR反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 taq バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
20 $\mu$ M primer7	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M オリゴdTprimer	1 $\mu$ l
ミリQ	35 $\mu$ l
taq polymerase(5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

#### 【0064】

PCR反応条件

94°C 1 min(PAD)

94°C 30 sec (変性)

52°C 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72°C 1 min (プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行った。

72°C 7 min (最後の伸長)

4°C 保持

#### 【0065】

アガロースゲル電気泳動で、増幅された約1000bpのバンドを切り出し、精製した。精製したDNA断片をpT7-blue vector(Novagen)にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌よりplasmid DNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。

得られた全長の塩基配列を配列表の配列番号 2 に示し、全長のアミノ酸配列を配列表の配列番号 1 に示す。このクローンを COR と命名した。

#### 【 0 0 6 6 】

##### (7) 大腸菌での蛋白発現

得られた全長の塩基配列より、蛋白の N 末端に相当する部分でプライマーを作製し、C 末端側はオリゴ dT プライマーを使用して、(2) で調製した First strand cDNA を鋳型として PCR を行った。

使用プライマー

5' -GGGGGATCCGACCATGGCTCTTTCAAAGCACGGTC-3' (primer 8) (配列番号 1 0)

#### 【 0 0 6 7 】

##### PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 $\mu$ l
X10 pyrobest バッファー	5 $\mu$ l
2.5 mM dNTPs	4 $\mu$ l
100 $\mu$ M primer8	1 $\mu$ l
100 $\mu$ M オリゴ dT プライマー	1 $\mu$ l
ミリQ	35 $\mu$ l
pyrobest polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

#### 【 0 0 6 8 】

##### PCR 反応条件

94℃ 1 min (PAD)

94℃ 30 sec (変性)

52℃ 30 sec (鋳型へのプライマーのアニーリング)

72℃ 1 min (プライマー伸長)

上記 3 ステップを 30 サイクル行った。

72℃ 7 min (最後の伸長)

4℃ 保持

#### 【 0 0 6 9 】

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約 1000 bp のバンドを切り出し、精

製してpRSET vector(Invitrogen)のBamHI、EcoRI部位にサブクローニングして、大腸菌株(JM109-DE3)で発現させた。発現蛋白はN末端にHis-tagが付くようにコンストラクトしたので発現蛋白はNi-Agarose gel(QIAGEN)で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。次に精製した蛋白の性質を解析した。

#### 【0070】

##### (8) 蛍光特性の解析

20 $\mu$ M蛍光蛋白(COR)、150 mM KCl, 50 mM HEPES pH 7.5溶液を用いて、吸収スペクトルを測定した(図2)。このスペクトルのピーク(557 nm)の値よりモル吸光係数を計算した。520 nmの吸収が0.002となるように蛍光蛋白を上記の緩衝液で希釈し、520 nmで励起した時の蛍光スペクトルと600 nmの蛍光による励起スペクトルを測定した(図1)。DsRed2(CLONTECH)を同様に520 nmの吸収が0.002となるようにして蛍光スペクトルを測定し、DsRed2の量子収率を0.55として今回クローニングされた蛍光蛋白の量子収率を求めた。測定結果を表1に示す。

#### 【0071】

【表1】

表1

	励起極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	pH感受性	アミノ酸数
COR	557nm	574nm	41760 (557nm)	0.41	pKa<4.0	232

#### 【0072】

##### (9) pH感受性の測定

蛍光蛋白を各緩衝液で同濃度に希釈し、557 nmの吸収の値をとりpH感受性を測定した。各pHの緩衝液は次の通り、

pH 4、5 : 酢酸バッファー

pH 6、11 : リン酸バッファー

pH 7、8 : HEPESバッファー

pH 9、10 : グリシンバッファー

測定結果を図3に示す。



## 【 0 0 7 3 】

## 【発明の効果】

本発明により、コモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の新規な蛍光蛋白質が提供されることになった。本発明の蛍光蛋白質は、従来の蛍光蛋白質とは一次構造が異なる新規な蛋白質である。本発明の蛍光蛋白質は、所定の蛍光特性を有し、分子生物学的分析において有用である。特に、本発明の蛍光蛋白質は、従来の R F P (DsRed、クロンテック社) の示す幅広い励起スペクトルに比べ、よりシャープなスペクトルを有している。また、本発明の蛍光蛋白質に変異を導入することにより、赤色領域の蛍光特性をより多様化させることができる。

## 【 0 0 7 4 】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; RIKEN

&lt;120&gt; Fluorescent protein

&lt;130&gt; A31368A

&lt;160&gt; 10

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 232

&lt;212&gt; PRT

<213> *Montipora* sp.

&lt;400&gt; 1

Met Ala Leu Ser Lys His Gly Leu Thr Lys Asn Met Thr Thr Lys Tyr

1

5

10

15

Arg Met Glu Gly Cys Val Asp Gly His Lys Phe Val Ile Thr Gly Asp

20

25

30

Gly Ile Gly Asp Pro Phe Glu Gly Lys Gln Thr Ser Ile Asp Leu Cys

35

40

45

Val Val Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ser Glu Asp Ile Leu Ser Ala

50

55

60

Val Phe Asp Tyr Gly Asn Arg Val Phe Thr Lys Tyr Pro Gln Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Val Asp Tyr Phe Lys Asn Ser Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Trp Gln Arg  
 85 90 95  
 Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Ala Ser Ala Asp Ile  
 100 105 110  
 Arg Val Ser Val Glu Glu Asn Cys Phe Tyr His Glu Ser Lys Phe His  
 115 120 125  
 Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Lys Met Thr Thr  
 130 135 140  
 Asn Trp Glu Pro Ser Cys Glu Lys Ile Thr Pro Ile Leu Asn Glu Gly  
 145 150 155 160  
 Ile Leu Lys Gly Asp Val Thr Met Phe Leu Leu Leu Lys Asp Gly Gly  
 165 170 175  
 Arg Tyr Arg Cys Gln Phe Asp Thr Val Tyr Lys Ala Lys Ala Asp Ala  
 180 185 190  
 Lys Lys Met Pro Glu Trp His Phe Ile Gln His Lys Leu Thr Arg Glu  
 195 200 205  
 Asp Arg Ser Asp Ala Lys His Gln Lys Trp Arg Leu Val Glu Asn Ala  
 210 215 220  
 Ile Ala Tyr Arg Ser Thr Leu Pro  
 225 230  
 <210> 2  
 <211> 699  
 <212> DNA  
 <213> Montipora sp.  
 <400> 2  
 atg gct ctt tca aag cac ggt cta aca aag aac atg acg acg aaa tac 48  
 Met Ala Leu Ser Lys His Gly Leu Thr Lys Asn Met Thr Thr Lys Tyr

1	5	10	15
cgc atg gaa ggg tgt gtc gat ggg cat aaa ttt gta atc acg ggc gac 96			
Arg Met Glu Gly Cys Val Asp Gly His Lys Phe Val Ile Thr Gly Asp			
20	25	30	
ggc att gga gat cct ttc gaa ggg aaa cag act agt att gat ctg tgt 144			
Gly Ile Gly Asp Pro Phe Glu Gly Lys Gln Thr Ser Ile Asp Leu Cys			
35	40	45	
gtg gtt gaa ggg gga cca ctg cca ttc tcc gaa gat ata ttg tct gct 192			
Val Val Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ser Glu Asp Ile Leu Ser Ala			
50	55	60	
gtg ttt gac tac gga aac agg gtc ttt act aaa tat cct caa gac ctt 240			
Val Phe Asp Tyr Gly Asn Arg Val Phe Thr Lys Tyr Pro Gln Asp Leu			
65	70	75	80
gtt gac tat ttc aag aac tca tgt cct gct gga tat aca tgg caa agg 288			
Val Asp Tyr Phe Lys Asn Ser Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Trp Gln Arg			
85	90	95	
tct ttt ctc ttt gaa gat ggt gca gtt tgc aca gcc agt gca gat ata 336			
Ser Phe Leu Phe Glu Asp Gly Ala Val Cys Thr Ala Ser Ala Asp Ile			
100	105	110	
aga gtg agt gtt gag gag aac tgc ttt tat cac gag tcc aag ttt cat 384			
Arg Val Ser Val Glu Glu Asn Cys Phe Tyr His Glu Ser Lys Phe His			
115	120	125	
gga gtg aac ttt cct gct gat gga cct gtg atg aaa aag atg aca act 432			
Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Lys Lys Met Thr Thr			
130	135	140	
aat tgg gaa cca tcc tgc gag aaa atc aca cca ata ctt aat gag ggg 480			
Asn Trp Glu Pro Ser Cys Glu Lys Ile Thr Pro Ile Leu Asn Glu Gly			
145	150	155	160
ata ttg aaa gga gat gtc acc atg ttc ctc ctt ctg aag gat ggt ggg 528			

Ile Leu Lys Gly Asp Val Thr Met Phe Leu Leu Leu Lys Asp Gly Gly  
 165 170 175  
 cgt tac cgg tgc cag ttc gac aca gtt tac aaa gca aag gct gac gca 576  
 Arg Tyr Arg Cys Gln Phe Asp Thr Val Tyr Lys Ala Lys Ala Asp Ala  
 180 185 190  
 aaa aag atg ccg gaa tgg cac ttc atc caa cat aag ctc acc cgg gaa 624  
 Lys Lys Met Pro Glu Trp His Phe Ile Gln His Lys Leu Thr Arg Glu  
 195 200 205  
 gac cgc agc gat gct aag cac cag aaa tgg cga ctg gta gaa aat gct 672  
 Asp Arg Ser Asp Ala Lys His Gln Lys Trp Arg Leu Val Glu Asn Ala  
 210 215 220  
 att gca tac cga tcc aca tta ccc tga 699  
 Ile Ala Tyr Arg Ser Thr Leu Pro  
 225 230

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 3

gaaggrtgyg tcaayggrca y 21

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 4

acvggdccaat ydgvaagaaa rtt

23

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

ggccacgcgt cgactagtagt gggiigggii gggiig

36

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

ccatcttcaa agagaaaaga ccttt

25

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

ggccacgcgt cgactagtagt

20

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

catgagttct tgaaatagtc aac 23

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

atggctcttt caaagcacgg tc 22

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

gggggatccg accatggctc tttcaaagca cggtc 35

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明のコモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の蛍光蛋白質 (COR) の蛍光スペクトル及び励起スペクトルを測定した結果を示す。

【図 2】

図 2 は、本発明のコモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の蛍光蛋白質 (COR) の吸収スペクトルを示す。

【図 3】

図 3 は、本発明のコモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の蛍光蛋白質 (COR) の

pH感受性を示す。横軸はpH値を示し、縦軸は吸光度を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

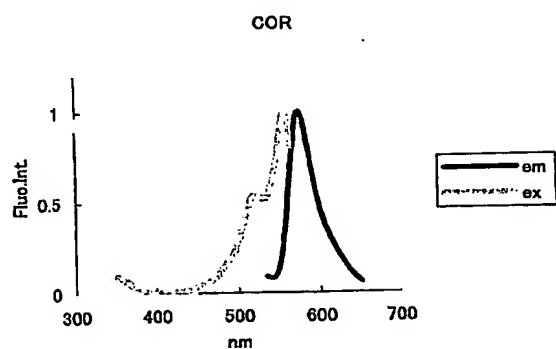


図1 蛍光スペクトル及び励起スペクトル

【図 2】

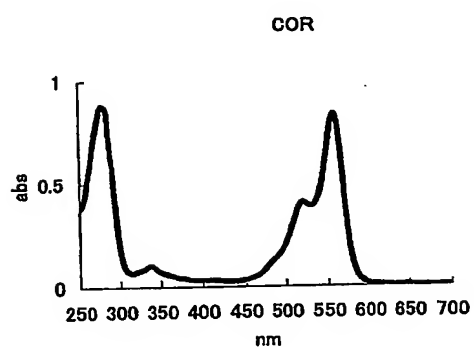


図2 吸収スペクトル

【図 3】

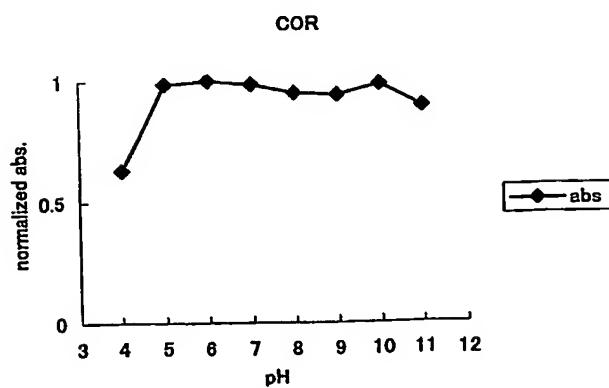


図3 pH感受性



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コモンサンゴ (*Montipora* sp.) に由来する、新規な蛍光蛋白質を提供すること。

【解決手段】 コモンサンゴ (*Montipora* sp.) 由来の下記の特性を有する蛍光蛋白質。

- (1) 励起極大波長が 557 nm である；
- (2) 蛍光極大波長が 574 nm である；
- (3) 557 nm におけるモル吸光係数が 41750 である；
- (4) 量子収率が 0.41 である；
- (5) 光吸収特性の pH 感受性が  $pK_a < 約 4.0$  である；

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-170327
受付番号	50300999359
書類名	特許願
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成 15 年 10 月 9 日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	000006792
【住所又は居所】	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
【氏名又は名称】	理化学研究所

## 【特許出願人】

申請人	
【識別番号】	110000109
【住所又は居所】	東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階
【氏名又は名称】	特許業務法人特許事務所サイクス

## 【代理人】

【識別番号】	110000109
【住所又は居所】	東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階
【氏名又は名称】	特許業務法人特許事務所サイクス

【書類名】 手続補正書  
【整理番号】 A31368A  
【提出日】 平成15年 7月15日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003-170327  
【補正をする者】  
【識別番号】 000006792  
【氏名又は名称】 理化学研究所  
【補正をする者】  
【識別番号】 390004097  
【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所  
【代理人】  
【識別番号】 110000109  
【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス  
【代表者】 今村 正純  
【発送番号】 066122  
【手続補正1】  
【補正対象書類名】 特許願  
【補正対象項目名】 特許出願人  
【補正方法】 変更  
【補正の内容】  
【特許出願人】  
【識別番号】 000006792  
【氏名又は名称】 理化学研究所  
【特許出願人】  
【識別番号】 390004097  
【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-170327
受付番号	50301168976
書類名	手続補正書
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成 15 年 7 月 18 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

## 【補正をする者】

【識別番号】	000006792
【住所又は居所】	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
【氏名又は名称】	理化学研究所

## 【補正をする者】

【識別番号】	390004097
【住所又は居所】	愛知県名古屋市中区丸の内 3 丁目 5 番 10 号 住 友商事丸の内ビル 5 F
【氏名又は名称】	株式会社医学生物学研究所

## 【代理人】

申請人	
【識別番号】	110000109
【住所又は居所】	東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階
【氏名又は名称】	特許業務法人特許事務所サイクス

【書類名】	出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】	平成15年12月 1日
【あて先】	特許庁長官殿
【事件の表示】	
【出願番号】	特願2003-170327
【承継人】	
【識別番号】	503359821
【住所又は居所】	埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
【氏名又は名称】	独立行政法人理化学研究所
【承継人代理人】	
【識別番号】	100075812
【弁理士】	
【氏名又は名称】	吉武 賢次
【提出物件の目録】	
【物件名】	権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】	平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件 にかか一般承継による特許権の移転登録申請書
【物件名】	登記簿謄本 1
【援用の表示】	平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件 にかか一般承継による特許権の移転登録申請書
【物件名】	委任状 1

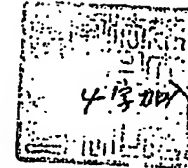
【物件名】

委任状

【添付書類】 335



委 任 状



私は、

識別番号 100075812 弁理士 吉 武 賢 次 氏

を代理人と定めて下記事項を委任する。

1. 別紙目録に記載の特許出願に関する出願人名義変更届をする件  
954件
2. 上記各項の手続を処理するため復代理人を選任及び解任する件

以 上

平成 / 5 年 / 1 月 / 3 日

住所又は居所

埼玉県和光市広沢2番1号

氏名又は名称

独立行政法人 理化学研究所

代 表 者

理事長 野 依 良 治



## 目録(1)

- |                                 |                   |
|---------------------------------|-------------------|
| 1. 特願昭63-235737                 | 51. 特願平07-327372  |
| 2. 特願平05-044143                 | 52. 特願平08-000652  |
| 3. 特願平05-127257                 | 53. 特願平08-026368  |
| 4. 特願平05-127258                 | 54. 特願平08-030850  |
| 5. 特願平05-213675                 | 55. 特願平08-041279  |
| 6. 特願平05-306164                 | 56. 特願平08-045903  |
| 7. 特願平05-328611                 | 57. 特願平08-051604  |
| 8. 特願平05-336746                 | 58. 特願平08-065715  |
| 9. 特願平06-035100                 | 59. 特願平08-070071  |
| 10. 特願平06-061792                | 60. 特願平08-105667  |
| 11. 特願平06-061793                | 61. 特願平08-107784  |
| 12. 特願平06-069150                | 62. 特願平08-116473  |
| 13. 特願平06-097098                | 63. 特願平08-123475  |
| 14. 特願平06-111624                | 64. 特願平08-127005  |
| 15. 特願平06-121100                | 65. 特願平08-131746  |
| 16. 特願平06-145908                | 66. 特願平08-132846  |
| 17. 特願平06-158670                | 67. 特願平08-132854  |
| 18. 特願平06-158671                | 68. 特願平08-142676  |
| 19. 特願平06-165751                | 69. 特願平08-158078  |
| 20. 特願平06-165752                | 70. 特願平08-167401  |
| 21. 特願平06-181857                | 71. 特願平08-196331  |
| 22. 特願平06-235742                | 72. 特願平08-197050  |
| 23. 特願平06-238603                | 73. 特願平08-197051  |
| 24. 特願平06-244764                | 74. 特願平08-211946  |
| 25. 特願平06-248486                | 75. 特願平08-216506  |
| 26. 特願平06-252942                | 76. 特願平08-216508  |
| 27. 特願平06-268723                | 77. 特願平08-222352  |
| 28. 特願平06-293933                | 78. 特願平08-231066  |
| 29. 特願平06-301372                | 79. 特願平08-233442  |
| 30. 特願平06-323795                | 80. 特願平08-236685  |
| 31. 特願平06-324490                | 81. 特願平08-251410  |
| 32. 特願平06-507966 (特願2002-12420) | 82. 特願平08-262051  |
| 33. 特願平07-007185                | 83. 特願平08-302896  |
| 34. 特願平07-069255                | 84. 特願平08-308335  |
| 35. 特願平07-082880                | 85. 特願平08-308336  |
| 36. 特願平07-083142                | 86. 特願平08-311467  |
| 37. 特願平07-117933                | 87. 特願平08-315093  |
| 38. 特願平07-133487                | 88. 特願平08-317622  |
| 39. 特願平07-205141                | 89. 特願平08-320241  |
| 40. 特願平07-214659                | 90. 特願平08-506395  |
| 41. 特願平07-217276                | 91. 特願平09-002295  |
| 42. 特願平07-236185                | 92. 特願平09-010802  |
| 43. 特願平07-240684                | 93. 特願平09-019968  |
| 44. 特願平07-249244                | 94. 特願平09-019969  |
| 45. 特願平07-259922                | 95. 特願平09-019971  |
| 46. 特願平07-282716                | 96. 特願平09-024890  |
| 47. 特願平07-302793                | 97. 特願平09-028982  |
| 48. 特願平07-306004                | 98. 特願平09-046824  |
| 49. 特願平07-311711                | 99. 特願平09-049254  |
| 50. 特願平07-311715                | 100. 特願平09-053478 |

## 目録(2)

- |                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| 101. 特願平09-054595 | 151. 特願平10-045434 |
| 102. 特願平09-056654 | 152. 特願平10-049499 |
| 103. 特願平09-057342 | 153. 特願平10-049867 |
| 104. 特願平09-058774 | 154. 特願平10-051489 |
| 105. 特願平09-067611 | 155. 特願平10-051490 |
| 106. 特願平09-074394 | 156. 特願平10-051491 |
| 107. 特願平09-080480 | 157. 特願平10-051492 |
| 108. 特願平09-082965 | 158. 特願平10-051493 |
| 109. 特願平09-091523 | 159. 特願平10-060740 |
| 110. 特願平09-091591 | 160. 特願平10-060741 |
| 111. 特願平09-091694 | 161. 特願平10-061895 |
| 112. 特願平09-096988 | 162. 特願平10-076139 |
| 113. 特願平09-099061 | 163. 特願平10-085207 |
| 114. 特願平09-099109 | 164. 特願平10-085208 |
| 115. 特願平09-104093 | 165. 特願平10-103083 |
| 116. 特願平09-119730 | 166. 特願平10-103115 |
| 117. 特願平09-129068 | 167. 特願平10-103671 |
| 118. 特願平09-134525 | 168. 特願平10-104093 |
| 119. 特願平09-147964 | 169. 特願平10-113493 |
| 120. 特願平09-155364 | 170. 特願平10-116378 |
| 121. 特願平09-159963 | 171. 特願平10-121456 |
| 122. 特願平09-163630 | 172. 特願平10-127520 |
| 123. 特願平09-163631 | 173. 特願平10-136198 |
| 124. 特願平09-171924 | 174. 特願平10-149603 |
| 125. 特願平09-175896 | 175. 特願平10-150494 |
| 126. 特願平09-180423 | 176. 特願平10-151245 |
| 127. 特願平09-189436 | 177. 特願平10-155838 |
| 128. 特願平09-198201 | 178. 特願平10-155841 |
| 129. 特願平09-208866 | 179. 特願平10-156104 |
| 130. 特願平09-221067 | 180. 特願平10-156108 |
| 131. 特願平09-228345 | 181. 特願平10-198313 |
| 132. 特願平09-230870 | 182. 特願平10-200280 |
| 133. 特願平09-253740 | 183. 特願平10-217132 |
| 134. 特願平09-256795 | 184. 特願平10-217180 |
| 135. 特願平09-271782 | 185. 特願平10-222837 |
| 136. 特願平09-281995 | 186. 特願平10-227939 |
| 137. 特願平09-287084 | 187. 特願平10-229591 |
| 138. 特願平09-307827 | 188. 特願平10-232520 |
| 139. 特願平09-308597 | 189. 特願平10-232590 |
| 140. 特願平09-309848 | 190. 特願平10-236009 |
| 141. 特願平09-327140 | 191. 特願平10-237485 |
| 142. 特願平09-327609 | 192. 特願平10-238144 |
| 143. 特願平09-328742 | 193. 特願平10-245293 |
| 144. 特願平09-360327 | 194. 特願平10-250598 |
| 145. 特願平10-002030 | 195. 特願平10-250611 |
| 146. 特願平10-010471 | 196. 特願平10-252128 |
| 147. 特願平10-014152 | 197. 特願平10-260347 |
| 148. 特願平10-015690 | 198. 特願平10-260416 |
| 149. 特願平10-024892 | 199. 特願平10-268791 |
| 150. 特願平10-043335 | 200. 特願平10-269859 |



## 目録(3)

- |                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| 201. 特願平10-272529 | 251. 特願平11-135137  |
| 202. 特願平10-280351 | 252. 特願平11-135482  |
| 203. 特願平10-308533 | 253. 特願平11-143429  |
| 204. 特願平10-309765 | 254. 特願平11-144005  |
| 205. 特願平10-311673 | 255. 特願平11-147097  |
| 206. 特願平10-311674 | 256. 特願平11-151099  |
| 207. 特願平10-311675 | 257. 特願平11-166247  |
| 208. 特願平10-314856 | 258. 特願平11-173839  |
| 209. 特願平10-315751 | 259. 特願平11-179278  |
| 210. 特願平10-338896 | 260. 特願平11-186052  |
| 211. 特願平10-338897 | 261. 特願平11-193235  |
| 212. 特願平10-338898 | 262. 特願平11-224269  |
| 213. 特願平10-338899 | 263. 特願平11-225060  |
| 214. 特願平10-352428 | 264. 特願平11-225832  |
| 215. 特願平10-354665 | 265. 特願平11-225839  |
| 216. 特願平10-363297 | 266. 特願平11-226176  |
| 217. 特願平10-363329 | 267. 特願平11-234800  |
| 218. 特願平10-506788 | 268. 特願平11-240325  |
| 219. 特願平10-532832 | 269. 特願平11-240910  |
| 220. 特願平10-535583 | 270. 特願平11-241737  |
| 221. 特願平11-008183 | 271. 特願平11-242438  |
| 222. 特願平11-013380 | 272. 特願平11-242490  |
| 223. 特願平11-015176 | 273. 特願平11-253851  |
| 224. 特願平11-031724 | 274. 特願平11-260947  |
| 225. 特願平11-035776 | 275. 特願平11-277759  |
| 226. 特願平11-046372 | 276. 特願平11-278976  |
| 227. 特願平11-055835 | 277. 特願平11-279324  |
| 228. 特願平11-055867 | 278. 特願平11-281632  |
| 229. 特願平11-055930 | 279. 特願平11-303976  |
| 230. 特願平11-056957 | 280. 特願平11-309616  |
| 231. 特願平11-057381 | 281. 特願平11-315036  |
| 232. 特願平11-057749 | 282. 特願平11-321282  |
| 233. 特願平11-058103 | 283. 特願平11-336079  |
| 234. 特願平11-061079 | 284. 特願平11-346467  |
| 235. 特願平11-061080 | 285. 特願平11-354563  |
| 236. 特願平11-064193 | 286. 特願平11-360274  |
| 237. 特願平11-064372 | 287. 特願平11-365899  |
| 238. 特願平11-064506 | 288. 特願平11-373483  |
| 239. 特願平11-065136 | 289. 特願平11-510791  |
| 240. 特願平11-074385 | 290. 特願平11-515324  |
| 241. 特願平11-081225 | 291. 特願2000-001783 |
| 242. 特願平11-090383 | 292. 特願2000-005221 |
| 243. 特願平11-091875 | 293. 特願2000-009363 |
| 244. 特願平11-103231 | 294. 特願2000-010516 |
| 245. 特願平11-104509 | 295. 特願2000-011147 |
| 246. 特願平11-106920 | 296. 特願2000-011623 |
| 247. 特願平11-124187 | 297. 特願2000-016518 |
| 248. 特願平11-130771 | 298. 特願2000-016622 |
| 249. 特願平11-130814 | 299. 特願2000-017112 |
| 250. 特願平11-130815 | 300. 特願2000-018612 |

## 目録(4)

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 301. 特願2000-019195 | 351. 特願2000-141763 |
| 302. 特願2000-019528 | 352. 特願2000-148843 |
| 303. 特願2000-020067 | 353. 特願2000-152455 |
| 304. 特願2000-030321 | 354. 特願2000-152469 |
| 305. 特願2000-034109 | 355. 特願2000-154484 |
| 306. 特願2000-039082 | 356. 特願2000-161895 |
| 307. 特願2000-040355 | 357. 特願2000-163122 |
| 308. 特願2000-041927 | 358. 特願2000-164584 |
| 309. 特願2000-041929 | 359. 特願2000-179723 |
| 310. 特願2000-045318 | 360. 特願2000-181281 |
| 311. 特願2000-045855 | 361. 特願2000-184259 |
| 312. 特願2000-051488 | 362. 特願2000-184295 |
| 313. 特願2000-051650 | 363. 特願2000-191007 |
| 314. 特願2000-052040 | 364. 特願2000-191265 |
| 315. 特願2000-053707 | 365. 特願2000-192332 |
| 316. 特願2000-054949 | 366. 特願2000-193817 |
| 317. 特願2000-056093 | 367. 特願2000-195384 |
| 318. 特願2000-056879 | 368. 特願2000-196991 |
| 319. 特願2000-057564 | 369. 特願2000-197022 |
| 320. 特願2000-057565 | 370. 特願2000-202801 |
| 321. 特願2000-057566 | 371. 特願2000-216457 |
| 322. 特願2000-058133 | 372. 特願2000-223714 |
| 323. 特願2000-058282 | 373. 特願2000-224970 |
| 324. 特願2000-062316 | 374. 特願2000-225486 |
| 325. 特願2000-064142 | 375. 特願2000-225864 |
| 326. 特願2000-064209 | 376. 特願2000-225978 |
| 327. 特願2000-071119 | 377. 特願2000-226361 |
| 328. 特願2000-076122 | 378. 特願2000-229191 |
| 329. 特願2000-085874 | 379. 特願2000-230551 |
| 330. 特願2000-089078 | 380. 特願2000-237165 |
| 331. 特願2000-092693 | 381. 特願2000-237166 |
| 332. 特願2000-100395 | 382. 特願2000-237533 |
| 333. 特願2000-105139 | 383. 特願2000-246309 |
| 334. 特願2000-105917 | 384. 特願2000-248331 |
| 335. 特願2000-107180 | 385. 特願2000-249232 |
| 336. 特願2000-108409 | 386. 特願2000-256149 |
| 337. 特願2000-109638 | 387. 特願2000-257080 |
| 338. 特願2000-109954 | 388. 特願2000-257083 |
| 339. 特願2000-118361 | 389. 特願2000-260030 |
| 340. 特願2000-120874 | 390. 特願2000-261233 |
| 341. 特願2000-123634 | 391. 特願2000-264743 |
| 342. 特願2000-128431 | 392. 特願2000-265344 |
| 343. 特願2000-131049 | 393. 特願2000-278502 |
| 344. 特願2000-131050 | 394. 特願2000-279557 |
| 345. 特願2000-131745 | 395. 特願2000-292422 |
| 346. 特願2000-134427 | 396. 特願2000-292832 |
| 347. 特願2000-136551 | 397. 特願2000-299812 |
| 348. 特願2000-136572 | 398. 特願2000-307464 |
| 349. 特願2000-138977 | 399. 特願2000-308248 |
| 350. 特願2000-141566 | 400. 特願2000-309581 |

## 目録(5)

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 401. 特願2000-319775 | 451. 特願2001-071435 |
| 402. 特願2000-322056 | 452. 特願2001-072650 |
| 403. 特願2000-333311 | 453. 特願2001-072668 |
| 404. 特願2000-334686 | 454. 特願2001-072963 |
| 405. 特願2000-334969 | 455. 特願2001-073028 |
| 406. 特願2000-343912 | 456. 特願2001-074964 |
| 407. 特願2000-347398 | 457. 特願2001-074965 |
| 408. 特願2000-347865 | 458. 特願2001-077257 |
| 409. 特願2000-358121 | 459. 特願2001-078671 |
| 410. 特願2000-368566 | 460. 特願2001-084173 |
| 411. 特願2000-374626 | 461. 特願2001-089541 |
| 412. 特願2000-375090 | 462. 特願2001-091911 |
| 413. 特願2000-378421 | 463. 特願2001-092337 |
| 414. 特願2000-378942 | 464. 特願2001-116171 |
| 415. 特願2000-378950 | 465. 特願2001-124294 |
| 416. 特願2000-384771 | 466. 特願2001-124452 |
| 417. 特願2000-387016 | 467. 特願2001-127575 |
| 418. 特願2000-394815 | 468. 特願2001-127576 |
| 419. 特願2000-396445 | 469. 特願2001-135357 |
| 420. 特願2000-399840 | 470. 特願2001-137087 |
| 421. 特願2000-400336 | 471. 特願2001-138103 |
| 422. 特願2000-401110 | 472. 特願2001-142583 |
| 423. 特願2000-401245 | 473. 特願2001-147081 |
| 424. 特願2000-401258 | 474. 特願2001-152364 |
| 425. 特願2000-503838 | 475. 特願2001-152379 |
| 426. 特願2000-571733 | 476. 特願2001-153447 |
| 427. 特願2000-571943 | 477. 特願2001-155572 |
| 428. 特願2000-602688 | 478. 特願2001-163740 |
| 429. 特願2000-602900 | 479. 特願2001-164819 |
| 430. 特願2000-618709 | 480. 特願2001-164997 |
| 431. 特願2001-003476 | 481. 特願2001-165133 |
| 432. 特願2001-005615 | 482. 特願2001-167910 |
| 433. 特願2001-007979 | 483. 特願2001-168784 |
| 434. 特願2001-016626 | 484. 特願2001-171705 |
| 435. 特願2001-025030 | 485. 特願2001-173331 |
| 436. 特願2001-037141 | 486. 特願2001-174421 |
| 437. 特願2001-037147 | 487. 特願2001-174553 |
| 438. 特願2001-042501 | 488. 特願2001-175898 |
| 439. 特願2001-044933 | 489. 特願2001-178169 |
| 440. 特願2001-047762 | 490. 特願2001-179858 |
| 441. 特願2001-050646 | 491. 特願2001-180552 |
| 442. 特願2001-053550 | 492. 特願2001-180554 |
| 443. 特願2001-054717 | 493. 特願2001-187735 |
| 444. 特願2001-059115 | 494. 特願2001-197185 |
| 445. 特願2001-059892 | 495. 特願2001-197897 |
| 446. 特願2001-060848 | 496. 特願2001-200854 |
| 447. 特願2001-062703 | 497. 特願2001-201356 |
| 448. 特願2001-065799 | 498. 特願2001-202971 |
| 449. 特願2001-065917 | 499. 特願2001-203089 |
| 450. 特願2001-068285 | 500. 特願2001-206505 |

## 目録(6)

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 501. 特願2001-206522 | 551. 特願2001-325367 |
| 502. 特願2001-206523 | 552. 特願2001-326872 |
| 503. 特願2001-209305 | 553. 特願2001-327853 |
| 504. 特願2001-212947 | 554. 特願2001-329023 |
| 505. 特願2001-216505 | 555. 特願2001-332188 |
| 506. 特願2001-220219 | 556. 特願2001-337467 |
| 507. 特願2001-226176 | 557. 特願2001-339396 |
| 508. 特願2001-228287 | 558. 特願2001-339593 |
| 509. 特願2001-228374 | 559. 特願2001-346035 |
| 510. 特願2001-235412 | 560. 特願2001-347318 |
| 511. 特願2001-235747 | 561. 特願2001-347637 |
| 512. 特願2001-238951 | 562. 特願2001-349614 |
| 513. 特願2001-241023 | 563. 特願2001-351730 |
| 514. 特願2001-243930 | 564. 特願2001-352189 |
| 515. 特願2001-246642 | 565. 特願2001-353038 |
| 516. 特願2001-249976 | 566. 特願2001-358446 |
| 517. 特願2001-254377 | 567. 特願2001-358581 |
| 518. 特願2001-254378 | 568. 特願2001-359710 |
| 519. 特願2001-255589 | 569. 特願2001-374928 |
| 520. 特願2001-256576 | 570. 特願2001-376591 |
| 521. 特願2001-257188 | 571. 特願2001-378757 |
| 522. 特願2001-261158 | 572. 特願2001-380473 |
| 523. 特願2001-266004 | 573. 特願2001-382537 |
| 524. 特願2001-266069 | 574. 特願2001-382539 |
| 525. 特願2001-266454 | 575. 特願2001-382599 |
| 526. 特願2001-267194 | 576. 特願2001-385258 |
| 527. 特願2001-267379 | 577. 特願2001-385512 |
| 528. 特願2001-267863 | 578. 特願2001-385513 |
| 529. 特願2001-272977 | 579. 特願2001-385538 |
| 530. 特願2001-273964 | 580. 特願2001-388116 |
| 531. 特願2001-276053 | 581. 特願2001-390122 |
| 532. 特願2001-279406 | 582. 特願2001-392087 |
| 533. 特願2001-280319 | 583. 特願2001-392088 |
| 534. 特願2001-285145 | 584. 特願2001-395196 |
| 535. 特願2001-291059 | 585. 特願2001-396120 |
| 536. 特願2001-292223 | 586. 特願2001-397762 |
| 537. 特願2001-292224 | 587. 特願2001-397998 |
| 538. 特願2001-293000 | 588. 特願2001-401139 |
| 539. 特願2001-293054 | 589. 特願2001-515803 |
| 540. 特願2001-293936 | 590. 特願2001-523852 |
| 541. 特願2001-294013 | 591. 特願2001-557672 |
| 542. 特願2001-298140 | 592. 特願2002-000993 |
| 543. 特願2001-298402 | 593. 特願2002-005746 |
| 544. 特願2001-307340 | 594. 特願2002-010344 |
| 545. 特願2001-309501 | 595. 特願2002-011558 |
| 546. 特願2001-309508 | 596. 特願2002-019752 |
| 547. 特願2001-309984 | 597. 特願2002-020329 |
| 548. 特願2001-310554 | 598. 特願2002-022499 |
| 549. 特願2001-313430 | 599. 特願2002-028046 |
| 550. 特願2001-319360 | 600. 特願2002-028109 |

## 目録(7)

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 601. 特願2002-040151 | 651. 特願2002-162157 |
| 602. 特願2002-042829 | 652. 特願2002-162211 |
| 603. 特願2002-044340 | 653. 特願2002-162365 |
| 604. 特願2002-044640 | 654. 特願2002-167759 |
| 605. 特願2002-046188 | 655. 特願2002-170068 |
| 606. 特願2002-047799 | 656. 特願2002-170902 |
| 607. 特願2002-053190 | 657. 特願2002-176435 |
| 608. 特願2002-053575 | 658. 特願2002-176583 |
| 609. 特願2002-055272 | 659. 特願2002-183722 |
| 610. 特願2002-057253 | 660. 特願2002-185966 |
| 611. 特願2002-057565 | 661. 特願2002-187362 |
| 612. 特願2002-057935 | 662. 特願2002-187957 |
| 613. 特願2002-057963 | 663. 特願2002-188281 |
| 614. 特願2002-066249 | 664. 特願2002-189265 |
| 615. 特願2002-070624 | 665. 特願2002-194627 |
| 616. 特願2002-070987 | 666. 特願2002-197812 |
| 617. 特願2002-071924 | 667. 特願2002-201443 |
| 618. 特願2002-074902 | 668. 特願2002-201575 |
| 619. 特願2002-078164 | 669. 特願2002-202118 |
| 620. 特願2002-081467 | 670. 特願2002-205814 |
| 621. 特願2002-081502 | 671. 特願2002-205825 |
| 622. 特願2002-083081 | 672. 特願2002-217714 |
| 623. 特願2002-084139 | 673. 特願2002-221188 |
| 624. 特願2002-085017 | 674. 特願2002-225469 |
| 625. 特願2002-087342 | 675. 特願2002-225724 |
| 626. 特願2002-094681 | 676. 特願2002-226859 |
| 627. 特願2002-095132 | 677. 特願2002-227286 |
| 628. 特願2002-095389 | 678. 特願2002-229686 |
| 629. 特願2002-100431 | 679. 特願2002-230562 |
| 630. 特願2002-106561 | 680. 特願2002-235294 |
| 631. 特願2002-119320 | 681. 特願2002-235737 |
| 632. 特願2002-120371 | 682. 特願2002-236838 |
| 633. 特願2002-123347 | 683. 特願2002-237058 |
| 634. 特願2002-128854 | 684. 特願2002-237092 |
| 635. 特願2002-133717 | 685. 特願2002-248946 |
| 636. 特願2002-133749 | 686. 特願2002-253322 |
| 637. 特願2002-134313 | 687. 特願2002-253689 |
| 638. 特願2002-141187 | 688. 特願2002-253697 |
| 639. 特願2002-141438 | 689. 特願2002-254096 |
| 640. 特願2002-142260 | 690. 特願2002-257924 |
| 641. 特願2002-149471 | 691. 特願2002-260788 |
| 642. 特願2002-149931 | 692. 特願2002-261499 |
| 643. 特願2002-150541 | 693. 特願2002-264969 |
| 644. 特願2002-154688 | 694. 特願2002-267114 |
| 645. 特願2002-154695 | 695. 特願2002-268987 |
| 646. 特願2002-154823 | 696. 特願2002-270917 |
| 647. 特願2002-158237 | 697. 特願2002-271375 |
| 648. 特願2002-158352 | 698. 特願2002-271473 |
| 649. 特願2002-160277 | 699. 特願2002-273996 |
| 650. 特願2002-162148 | 700. 特願2002-274469 |

## 目録(8)

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 701. 特願2002-276051 | 751. 特願2003-012738 |
| 702. 特願2002-282746 | 752. 特願2003-012774 |
| 703. 特願2002-286487 | 753. 特願2003-015968 |
| 704. 特願2002-289209 | 754. 特願2003-016044 |
| 705. 特願2002-295332 | 755. 特願2003-016940 |
| 706. 特願2002-296911 | 756. 特願2003-017397 |
| 707. 特願2002-299429 | 757. 特願2003-021499 |
| 708. 特願2002-301875 | 758. 特願2003-024347 |
| 709. 特願2002-303838 | 759. 特願2003-024620 |
| 710. 特願2002-312131 | 760. 特願2003-025277 |
| 711. 特願2002-320102 | 761. 特願2003-027647 |
| 712. 特願2002-320704 | 762. 特願2003-027648 |
| 713. 特願2002-325909 | 763. 特願2003-031882 |
| 714. 特願2002-325920 | 764. 特願2003-032932 |
| 715. 特願2002-332232 | 765. 特願2003-038206 |
| 716. 特願2002-339344 | 766. 特願2003-040642 |
| 717. 特願2002-339392 | 767. 特願2003-043961 |
| 718. 特願2002-339541 | 768. 特願2003-050153 |
| 719. 特願2002-339551 | 769. 特願2003-050446 |
| 720. 特願2002-341195 | 770. 特願2003-052520 |
| 721. 特願2002-343807 | 771. 特願2003-052602 |
| 722. 特願2002-344279 | 772. 特願2003-052613 |
| 723. 特願2002-345597 | 773. 特願2003-052877 |
| 724. 特願2002-347401 | 774. 特願2003-053023 |
| 725. 特願2002-348760 | 775. 特願2003-054182 |
| 726. 特願2002-349042 | 776. 特願2003-054798 |
| 727. 特願2002-354594 | 777. 特願2003-054799 |
| 728. 特願2002-357768 | 778. 特願2003-054846 |
| 729. 特願2002-357900 | 779. 特願2003-054847 |
| 730. 特願2002-358019 | 780. 特願2003-054848 |
| 731. 特願2002-358967 | 781. 特願2003-054849 |
| 732. 特願2002-360972 | 782. 特願2003-055452 |
| 733. 特願2002-360975 | 783. 特願2003-056628 |
| 734. 特願2002-368112 | 784. 特願2003-061426 |
| 735. 特願2002-376555 | 785. 特願2003-063532 |
| 736. 特願2002-376774 | 786. 特願2003-065013 |
| 737. 特願2002-376831 | 787. 特願2003-071028 |
| 738. 特願2002-379214 | 788. 特願2003-072979 |
| 739. 特願2002-380624 | 789. 特願2003-074168 |
| 740. 特願2002-381888 | 790. 特願2003-076107 |
| 741. 特願2002-382170 | 791. 特願2003-078999 |
| 742. 特願2002-383870 | 792. 特願2003-079598 |
| 743. 特願2002-521644 | 793. 特願2003-079613 |
| 744. 特願2002-532458 | 794. 特願2003-082466 |
| 745. 特願2002-546564 | 795. 特願2003-083318 |
| 746. 特願2002-548185 | 796. 特願2003-083433 |
| 747. 特願2002-570743 | 797. 特願2003-083480 |
| 748. 特願2003-003450 | 798. 特願2003-085193 |
| 749. 特願2003-012550 | 799. 特願2003-089026 |
| 750. 特願2003-012694 | 800. 特願2003-090331 |

## 目 録 (9)

- |                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| 801. 特願 2003-091446 | 851. 特願 2003-127135 |
| 802. 特願 2003-092654 | 852. 特願 2003-127150 |
| 803. 特願 2003-093642 | 853. 特願 2003-128818 |
| 804. 特願 2003-094272 | 854. 特願 2003-128897 |
| 805. 特願 2003-094719 | 855. 特願 2003-129347 |
| 806. 特願 2003-095770 | 856. 特願 2003-131313 |
| 807. 特願 2003-095884 | 857. 特願 2003-132280 |
| 808. 特願 2003-095885 | 858. 特願 2003-132605 |
| 809. 特願 2003-095886 | 859. 特願 2003-132806 |
| 810. 特願 2003-095904 | 860. 特願 2003-135591 |
| 811. 特願 2003-097283 | 861. 特願 2003-136445 |
| 812. 特願 2003-097327 | 862. 特願 2003-139397 |
| 813. 特願 2003-101917 | 863. 特願 2003-140684 |
| 814. 特願 2003-104928 | 864. 特願 2003-142303 |
| 815. 特願 2003-105362 | 865. 特願 2003-143932 |
| 816. 特願 2003-107267 | 866. 特願 2003-145221 |
| 817. 特願 2003-107268 | 867. 特願 2003-145390 |
| 818. 特願 2003-107647 | 868. 特願 2003-147820 |
| 819. 特願 2003-107885 | 869. 特願 2003-150690 |
| 820. 特願 2003-109575 | 870. 特願 2003-153014 |
| 821. 特願 2003-115750 | 871. 特願 2003-153015 |
| 822. 特願 2003-115793 | 872. 特願 2003-153016 |
| 823. 特願 2003-115847 | 873. 特願 2003-153985 |
| 824. 特願 2003-115888 | 874. 特願 2003-154009 |
| 825. 特願 2003-116232 | 875. 特願 2003-154841 |
| 826. 特願 2003-116895 | 876. 特願 2003-155397 |
| 827. 特願 2003-118161 | 877. 特願 2003-155407 |
| 828. 特願 2003-118186 | 878. 特願 2003-158017 |
| 829. 特願 2003-119749 | 879. 特願 2003-161005 |
| 830. 特願 2003-119930 | 880. 特願 2003-164126 |
| 831. 特願 2003-120934 | 881. 特願 2003-170051 |
| 832. 特願 2003-121233 | 882. 特願 2003-170324 |
| 833. 特願 2003-121261 | 883. 特願 2003-170325 |
| 834. 特願 2003-121273 | 884. 特願 2003-170326 |
| 835. 特願 2003-121780 | 885. 特願 2003-170327 |
| 836. 特願 2003-122245 | 886. 特願 2003-170328 |
| 837. 特願 2003-123984 | 887. 特願 2003-170329 |
| 838. 特願 2003-124654 | 888. 特願 2003-170330 |
| 839. 特願 2003-124655 | 889. 特願 2003-170573 |
| 840. 特願 2003-124826 | 890. 特願 2003-171576 |
| 841. 特願 2003-124829 | 891. 特願 2003-171619 |
| 842. 特願 2003-124833 | 892. 特願 2003-172898 |
| 843. 特願 2003-124835 | 893. 特願 2003-175819 |
| 844. 特願 2003-125388 | 894. 特願 2003-177298 |
| 845. 特願 2003-125403 | 895. 特願 2003-180198 |
| 846. 特願 2003-125405 | 896. 特願 2003-182958 |
| 847. 特願 2003-127090 | 897. 特願 2003-192763 |
| 848. 特願 2003-127093 | 898. 特願 2003-192775 |
| 849. 特願 2003-127109 | 899. 特願 2003-194837 |
| 850. 特願 2003-127130 | 900. 特願 2003-197229 |

## 目録(10)

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 901. 特願2003-198340 | 951. 特願2003-338191 |
| 902. 特願2003-204075 | 952. 特願2003-339542 |
| 903. 特願2003-205349 | 953. 特願2003-340181 |
| 904. 特願2003-205710 | 954. 特願2003-342519 |
| 905. 特願2003-206546 |                    |
| 906. 特願2003-207698 |                    |
| 907. 特願2003-207771 |                    |
| 908. 特願2003-207772 |                    |
| 909. 特願2003-207850 |                    |
| 910. 特願2003-270049 |                    |
| 911. 特願2003-271473 |                    |
| 912. 特願2003-272421 |                    |
| 913. 特願2003-275055 |                    |
| 914. 特願2003-277958 |                    |
| 915. 特願2003-279130 |                    |
| 916. 特願2003-283972 |                    |
| 917. 特願2003-284055 |                    |
| 918. 特願2003-286640 |                    |
| 919. 特願2003-289138 |                    |
| 920. 特願2003-293912 |                    |
| 921. 特願2003-296474 |                    |
| 922. 特願2003-298558 |                    |
| 923. 特願2003-299424 |                    |
| 924. 特願2003-303979 |                    |
| 925. 特願2003-304452 |                    |
| 926. 特願2003-304453 |                    |
| 927. 特願2003-305689 |                    |
| 928. 特願2003-305844 |                    |
| 929. 特願2003-306137 |                    |
| 930. 特願2003-307564 |                    |
| 931. 特願2003-313014 |                    |
| 932. 特願2003-315355 |                    |
| 933. 特願2003-318801 |                    |
| 934. 特願2003-321497 |                    |
| 935. 特願2003-322948 |                    |
| 936. 特願2003-324974 |                    |
| 937. 特願2003-326510 |                    |
| 938. 特願2003-327645 |                    |
| 939. 特願2003-327907 |                    |
| 940. 特願2003-328600 |                    |
| 941. 特願2003-328840 |                    |
| 942. 特願2003-330418 |                    |
| 943. 特願2003-330569 |                    |
| 944. 特願2003-331848 |                    |
| 945. 特願2003-332756 |                    |
| 946. 特願2003-333798 |                    |
| 947. 特願2003-333932 |                    |
| 948. 特願2003-334036 |                    |
| 949. 特願2003-334083 |                    |
| 950. 特願2003-336365 |                    |



認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-170327
受付番号	20308550878
書類名	出願人名義変更届 (一般承継)
担当官	小菅 博 2143
作成日	平成16年 3月16日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状 (代理権を証明する書面)	1
---------	------------------	---

特願 2 0 0 3 - 1 7 0 3 2 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 6 7 9 2 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住 所  
氏 名

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日  
新規登録  
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号  
理化学研究所

特願 2003-170327

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[110000109]

1. 変更年月日

2002年 2月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階

氏 名

特許業務法人特許事務所サイクス

特願 2003-170327

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[390004097]

1. 変更年月日

1998年 7月22日

[変更理由]

住所変更

住 所

愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内  
ビル5F

氏 名

株式会社医学生物学研究所

特願 2003-170327

出願人履歴情報

識別番号

[503359821]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住所

埼玉県和光市広沢2番1号

氏名

独立行政法人理化学研究所